

Afdeling SERH            Datum: 1983-11-26  
RAPPORT 83.88           Pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Hexestrol en Dienestrol.  
Een literatuuronderzoek.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling SERH  
(10x), afdeling Normalisatie (Humme), Projektbeheer,  
Projektleider, afdeling OCON, afdeling TOX, IVVO (2x),  
RIV (5x).



RAPPORT 83.88

pr.nr. 505.0620

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van hormonen.

Onderwerp: Hexoestrol en Dienestrol. Een literatuuroverzicht.

---

Er is een literatuuronderzoek uitgevoerd over het gebruik van hexestrol en dienestrol bij het mesten van vee. Voor beide stoffen geldt dat er een grote overeenkomst bestaat met diethylstilbestrol. Naast de overweldigende hoeveelheid literatuur over DES is die voor HEX en DE echter zeer beperkt.

De toediening van hexestrol geschiedt meestal als zodanig of als dicaprylaat en in de vorm van een implantatie in het oor, soms als injectie van een dispersie in water. Dienestrol staat als zodanig, of als diacetaat ter beschikking.

Voor studies over hexestrol bleken er drie haarden van onderzoek te bestaan:

Nederland, RIV (Huis in 't Veld, Kroes, Ruitenbergh e.a., 6 publikaties 1966-1971).

Japan (Tobioka, Ono, Tohyama, e.a., 3 publikaties 1978-1979)

Verenigd Koninkrijk (Harwood, Heitzman, Dixon, 6 publikaties, 1980-1983).

Voorts is er nog verspreid onderzoek in de periode 1957-1978, ook voornamelijk in het V.K. en verder in de Verenigde Staten.

Over dienestrol is nog minder gepubliceerd dan over hexestrol.

Wat de analyse betreft, er zijn methoden gepubliceerd berustend op RIA, DLC, GLC en GC-MS. In Duitsland is Nederlands kalfsvlees onderzocht op dienestrol.

Voor het verkrijgen van literatuur is gebruik gemaakt van de volgende bronnen:

RIV-Endolit literatuursysteem

Computeruitdraai CAP (Commonwealth Agricultural Bureau, UK)

Computeruitdraai TOXLINE (National Library of Medicine, USA)

Aanwezige literatuur op RIKILT en RIV

---

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerkers/samenstellers: T.D.B. van der Struijs, J.M. Weseman

Projectleider: dr W.G. de Ruig

## INHOUD

Inleiding

Nederlands onderzoek (RIV)

Japans onderzoek

Brits onderzoek (Heitzman c.s.)

Overig (vnl. Brits en Amerikaans) onderzoek

Analyse

## INLEIDING

Hoffman (1981) geeft een overzicht over metabolisme, residuen en toxicologie van anabolica.

Hoewel algemeen, zijn de bevindingen mede van toepassing op hexestrol en dienestrol.

Volgens hun hormonale aktiviteit kan er onderscheid gemaakt worden tussen componenten met estrogene, androgene en gestagene aktiviteit en volgens hun chemische structuur tussen endogene steroiden en andersoortige verbindingen. Verder kunnen deze verbindingen verdeeld worden in die met een goede of kleine aktiviteit.

Al de endogene steroiden hebben een lage orale aktiviteit, terwijl de niet endogene verbindingen in dit opzicht grote verschillen te zien geven.

Farmacokinetische studies hebben aangetoond dat de plasma eliminatietijd van anabolische sexhormonen tamelijk kort is en dat in vee de meeste van deze verbindingen worden uitgescheiden met de feces, waar 60-90% van de metabolieten worden gevonden in de vrije vorm, terwijl de steroiden uitgescheiden met de urine overheersend geconjugeerd zijn (glucuroniden, sulfaten) (Velle (1976), Hoffman, Karg (1976)).

Afhankelijk van de formulering en de absorptiesnelheid van de plaats van toediening kunnen residuen gedurende een lange periode aanwezig zijn in eetbaar dierlijk weefsel en de excreta, zoals bij de implantatie van langzame uitscheidingspellets of speciale kristallijne suspensies (Huis in 't Veld (1969); Hoffman (1975); Hoffman, Oettel (1976)).

Hierna wordt DES als voorbeeld genoemd. Aan de hand van uitscheidingscurven van DES worden de eerder genoemde uitspraken onderbouwd. (DES is, opgenomen in olie, ingespoten).

Significante residuen (ppb-ppm bereik) zullen alleen worden gevonden in de injectieplaats of plaats van implantatie (Vogt (1970); Hoffman (1975); Hoffman, Laschütza (1980)).

Voor wat betreft hexestrol en dienestrol is er vlees onderzocht (spiervlees, lever, nier en vet) door Harwood (1981).

Ryan (1976) geeft een overzicht van estrogene, androgene, progestagenen, corticosteroiden, prostaglandines en antithyroid hormonen.

De hormonen worden besproken bij het hoofdstukje van hun algemene eigenschappen zoals extrogenen, androgenen, progestagenen etc. In het hoofdstuk van de estrogenen komt DES uitgebreid aan de orde. Voor de HEX en DE analyse wordt opgemerkt dat biologische monsters net eender worden opgewerkt als voor DES. De detectie methode is o.a. m.b.v. TLC, in combinatie met vanille als sproeireagens (Waldschmidt (1972)). Van Waes Stuckey at al (1983) detekteerde hexestrol op basis van een blauwkleuring, ontstaan na een reactie tussen hexestrol en Na-molybdofosfowolframaat.



#### NEDERLANDS ONDERZOEK (RIV)

Na een vóórexperiment met één kalf (Huis in 't Veld (1966<sup>1</sup>, 1966<sup>2</sup>)), werden zes kalveren behandeld met 80 of 160 mg hexestrol en geslacht na 21 dagen. Er werden monsters genomen van lever, nieren en spiervlees (poot).

Noch in spierweefsel noch in organen werd de aanwezigheid van hexestrol aangetoond ( $< 2 \mu\text{g/kg}$ ) met de Allen-Daisy test (Allen-Daisy, 1923). Bij enige van de met hoge doses behandelde dieren was sprake van enige oestrogeen activiteit.

Ook werd geen uterotrope activiteit aangetoond met de methode van Tiecco (1961).

Voorts werden door Huis in 't Veld (1969<sup>2,3</sup>) tien kalveren eenmaal behandeld met hexestrol (160 mg subcutaan achter het oor) en na de "gebruikelijke" tijd geslacht.

Vijf hiervan gaven een positieve Tiecco en/of Allen-Daisy test; een kwantitatieve bepaling van de injectieplaats bij drie van deze kalveren volgens Allen-Daisy gaf slechts zeer lage residuwaarden: 2-10  $\mu\text{g/kg}$ .

Kroes, Ruitenbergh en Berkvens (1970) (1971) hebben histologisch onderzoek uitgevoerd aan kalveren die behandeld waren met DES of Hexestrol. Voor DES werd een 5% emulsie van DES dipropionaat gebruikt, voor hexestrol een 2,5 dispersie in water (Animed, Bussum). Er werd 80 of 160 mg DES of 100 mg hexestrol intramusculair toegediend. Bij slachten na 16 weken waren voor beide anabolica steeds veranderingen waargenomen van de glandulae Bartholini, van tuba, cervix en vagina waren wijzigingen bij hexestrol veel minder duidelijk als bij DES.

# JAPANS ONDERZOEK

Bij 6 Holsteinstieren, ieder 2x geïnjecteerd met 60 mg hexoestroldi-caprylaat, werden de volgende gehalten gevonden. (Tobioka, 1979) in µg/kg:

	Geslacht					
	4		8		12	
	weken na de 2e injectie					
oorbasis (injectieplaats)	108.0	531.3	49.0	101.5	18.0	37.5
diafragma	4.5	5.0	6.0	8.0	3.0	14.0
perirenaal vet	70.5	105.0	102.0	112.0	73.5	106.0
leverweefsel	nd		nd		nd	

In twee Suffolkschape geïnjecteerd met 15 mg hexoestroldicaprylaat en geslacht na 39 dagen werd teruggevonden:

Nier	< 0.2	nd	Pancreas	0.2	nd
Lever	5.2	< 0.2	Subcutaanvet	10.3	nd
	0.5	nd	Epidimyaal vet	6.8	nd

In geen van beide schape was hexestrol terug te vinden in perirenaal of omentaal vet, schouderspier, ribspier.

De analyses werden uitgevoerd met GLC.

Ono, Nakoma, Tohyama en Imamichi (1979) hebben jonge kippen 2.5, 5 en 7,5 mg hexestroldicaprylaat toegediend door injectie in de borstspier en na 2, 3, 4 en 8 weken geslacht. Er konden resten estrogene stof worden aangetoond in de borstspier (vooral in de injectieplaats), de bicept femoria spier, lever, andere organen (slokdarm, milt enz.), vet, kop en poot bij orale toediening van monsters aan jonge vrouwelijke ratten. Op grond van de resultaten wordt aangenomen dat hexestroldicaprylaat als oplossing in olie als oliedruppels op de injectieplaats blijft. Een deel van de olieoplossing blijft er voor een lange periode. De resten hexestroldicaprylaat worden langzaam geabsorbeerd, wat resulteert in een langdurige estrogene werking. Toevoeging van 0,007% dienestroldiacetaat aan het voer voor jonge kippen had geen invloed op de eierproduktie, eikwaliteit, gewichtstoename orgaangewrichten en leversamenstelling (Roberson, 1975), met literatuurverwijzingen waarin in enkele gevallen wel geringe invloeden werden gerapporteerd.



Wanneer hexestroidicaprylaat wordt toegediend als implantaat aan vee (Tobioka, 1978), is het hexestrol als glucuronide (Smith, 1948), dicaprylaat (Imori, 1967) en als vrij hexestrol (Exley, 1969) aanwezig.

BRITS ONDERZOEK (Heitzman c.s.)

Harwood e.a. (1980) bepaalden residuen van hexoestrol in weefsels en urine van runderen en schapen. De resultaten zijn weergegeven in bijgaande tabellen IV, V en VI.

De bepaling werd uitgevoerd met een RIA, na etherextractie en zuivering over een silicagel kolom, en al dan niet na hydrolyse (zie de tabellen).

TABLE IV. Residues of hexoestrol in heifers slaughtered 2 and 7 days after implantation of 60 mg hexoestrol

Tissue	Hexoestrol (pg/g or pg/ml)	
	2 days	7 days
Muscle (free)	30	35
Fat (free)	57	110
Liver (free)	70	77
(conj.)	259	84
Kidney (free)	140	<50
(conj.)	2188	2021
Urine (free)	2	0
(conj.)	16,800	7300
Bile (free)	10	0
(conj.)	4840	8920
Plasma	380	1200

TABLE V. Residues of hexoestrol in steers 90 days after implantation with hexoestrol alone or in combination with trenbolone acetate (TBA)

Tissue	Hexoestrol (pg/g or pg/ml)			
	Control*	Lower limit of detection mean $\pm$ 2 SD	Hexoestrol* (60 mg)	TBA + hexoestrol* (45 mg)
Muscle	10 $\pm$ 10 (10)	30	<30 (9)	44 $\pm$ 42 (11)
Liver (free)	4 $\pm$ 10 (7)	24	<24 (7)	<24 (7)
(conj.)	12 $\pm$ 10 (7)	32	94 $\pm$ 107 (9)	32 $\pm$ 93 (7)
Urine (free)	0 $\pm$ 0 (6)	0	6 $\pm$ 8 (7)	Not measured
(conj.)	2 $\pm$ 4 (6)	10	190 $\pm$ 137 (8)	Not measured
Plasma	1 $\pm$ 3 (6)	7	Not measured	<7 (7)

\*Each value is the mean value  $\pm$  SD with the number of observations in parentheses.  
Conj. - conjugated hexoestrol.

TABLE VI. Residues of hexoestrol in wether sheep at 60 days after implantation with 15 mg hexoestrol

Tissue	Hexoestrol (pg/g or pg/ml)		
	Control	Lower limit of detection mean $\pm$ 2 SD	Treated
Muscle	17 $\pm$ 19 (5)	55	72 $\pm$ 71 (6)
Fat	15 $\pm$ 20 (6)	55	<50 (6)
Liver (free)	20 $\pm$ 41 (4)	102	266 $\pm$ 135 (3)
(conj.)	12 $\pm$ 8 (4)	28	698 $\pm$ 386 (3)
Kidney (free)	4 $\pm$ 7 (3)	18	812 $\pm$ 884 (6)
(conj.)	22 $\pm$ 17 (6)	56	2295 $\pm$ 1884 (6)
Urine (free)	14 $\pm$ 28 (5)	70	92 $\pm$ 160 (6)
(conj.)	98 $\pm$ 98 (4)	294	3982 $\pm$ 3338 (6)

Each value is the mean value  $\pm$  SD with the number of observations in parentheses.

Dezelfde gegevens worden aangehaald door Dixon en Heitzman (1981) (1983).

Na implantatie met 36 of 45 mg hexoestrol in stieren en ossen, waren na 90-153 dagen nog residuen aantoonbaar in weefsels, in het bijzonder lever, urine, gal en feces (Heitzman en Harwood, 1983). Dus is minstens 100 dagen na implantatie nog mogelijk te bewijzen dat dieren met hexoestrol behandeld zijn.

Heitzman e.a. (1981) rapporteren het gebruik van implantaten van hexoestrol bij runderen en gevogelte. De concentraties van residuen in eetbare weefsels zijn buitengewoon laag ( $< 1 \mu\text{g/kg}$ ) "when the anabolic agents are used correctly according to the recommendations".

Heitzman (1983) beschrijft een snelle gevoelige en betrouwbare RIA methode tabel 3H of 125J.

Blanco waarden voor onbehandelde dieren

faeces  $113 \pm 98 \text{ pg/g}$

intra assay variantie 10.8%

inter assay variantie 11.1%

recovery 58.7%.

Concentratie HEX gemeten in faeces van 18 ossen en 14 stieren na implantatie van resp. 36, 45 en 60 mg Hex.

Residuen aantoonbaar in alle monsters tot 104 dagen na implantatie en in 9 van de 13 monsters genomen in periode 111 - 153 dagen na toediening. Residuen werden ook gemeten in eetbaar weefsel en lichaams vochten van 14 stieren en 8 ossen tussen 90 en 153 dagen na implantatie van 45 mg Hex.

Residuen gevonden in 82% van de gal monsters

73% van de urine monsters

64% van de lever monsters

82% van de nier monsters

27% van de spierweefsel monsters.

Gebruikte antibody Roussel-Uclaf 6024

Exp 1 Implantaten Groep 1 60 mg Hex

2 36 mg Hex 300 mg Trenb. acetaat



## OVERIG vnl. BRITS EN AMERIKAANS ONDERZOEK

Scott doet uitvoerig verslag van het gebruik van hexoestrol bij dierproeven in the United Kingdom en the USA.

Zijn literatuuroverzicht nemen wij integraal over.

### Hexoestrol

Another stilbene derivative, which came to be known as hexoestrol, was not much studied in husbandry trials in the USA and was apparently not used commercially there. Although thought to be as effective as a growth promoter it is not orally so potent an oestrogen for man as stilboestrol nor does it when used in excess cause such marked side-effects in ruminants, so it was thought likely to be safer in use (Hammond, 1957). It became available in the UK in the early 1950s as an implant and as a feed additive.

From 1957 onwards at least three of the national feed firms sold compounds containing hexoestrol, specifically for finishing cattle which were to be fed a standard amount of the special feed daily, normally containing 10 mg, over the weight range 270-450 kg for the three to four months prior to slaughter. Increases in liveweight gain of 15 per cent (sex not specified), and ranges of 21-52 per cent in trials with steers and very variable results with heifers, were mentioned in the advertising literature. The cost of the additive was quoted at about 10-20p per animal with an additional return of about £2. The risk of compounds containing oestrogen being fed to milking or breeding stock, or to other species, was considerable. The benefits could not be gained with grazing cattle unless supplementary feeds were given, and there was no possibility of treating some animals in a group and not others as there is with implantation. However, such products were reported as still being in use in 1970 (Kilkenny and Sutherland). Under the Treaty of Accession to the EEC the UK accepted a Directive on the use of additives in animal feedingstuffs, which makes no provision for use of hormonal products in this context, even within individual countries, except on veterinary prescription. Thus it is unlikely that feeds for cattle (or sheep) will ever again be available with such an additive.

In the USA it became usual to administer stilboestrol in feeds because it was shown early on that by that route it was less likely to produce side-effects in the animals than the relatively high levels of implantation used in the early experiments. Under conditions of almost universal yard feeding it was also very convenient. In the UK it was not, and the choice of hexoestrol made side-effects less likely, so that implantation was favoured. There is virtually no record in the technical literature of trial work with hexoestrol as a feed additive, but there is a great deal of evidence from the UK and elsewhere of its effect when used as an implant.

Lamming (1958) reported a series of trials in which increases in daily gains following implantation of various levels of hexoestrol ranged from 0.17 to 0.31 kg, and from 22-46 per cent over controls (in one other trial where stilboestrol was used the increase was 0.36 kg or 63 per cent, and this figure was quoted in the hexoestrol advertising leaflet). The responses were smallest in trials on spring grazing, became bigger later in the season, and were greatest in yard feeding. One of the main effects of treatment



was thought to be a stimulation of appetite, but the proportionately greater increase in growth rate meant that feed conversion ratios were improved. Burgess and Lamming (1960) reported in more detail some of the same experiments, one of which included a nil versus 30 mg hexoestrol comparison in Friesian steers in August/November. The response was an extra 0.26 kg liveweight gain per day.

Callow and Finney (1959) reported trials carried out in the Argentine in which Hereford steers were implanted with various levels of hexoestrol. The optimum dose turned out to be 30 mg per animal, and this produced an average increase in liveweight gain of 0.14 kg per day. Eighteen trials on the use of hexoestrol were carried out on NAAS Experimental Husbandry Farms and at the Norfolk Agricultural Station and the results were reported by Jones (1961). Some of the experiments compared one or more levels of hexoestrol given as a single implant, and others studied the effect of successive implants in the same animal. The general conclusion was that the best level to use was 45 or 60 mg as a single implant, and in the 11 trials with steers in which the comparison is possible this increased liveweight gain by an average of 0.15 kg per day, or 20 per cent. The effects on killing out percentages were not consistent but were never large. Generally speaking, fatness of the carcass was reduced, though this finding was obviously affected by the method of selection for slaughter. Successive implants in the same animals gave confusing results. Responses in heifers were far smaller. (Hexoestrol is now definitely not recommended for heifers, because of the likelihood of development of mammary tissue and the consequent assumption that they have been bred).

Everitt (1962) reported trials at Ruakura in which responses of two- and three-year-old Angus steers on pasture to hexoestrol implantation were very large, 0.32 and 0.45 kg per day. Forbes *et al.* (1964) carried out a small trial in which they studied the response to implantation with 30 mg hexoestrol on all-concentrate diets at two levels of protein. It produced a 20 per cent (0.21 kg per day) increase in liveweight gain at both levels.

Alder *et al.* (1964) studied the response to hexoestrol implantation in a series of four experiments with two-year-old steers at pasture. Significant increases in liveweight gain were recorded at all seasons on a variety of pasture types. Intakes were measured, and tended to be higher in the implanted cattle, leading to a higher weight of gut fill which accounted for 28 per cent of the improvement in liveweight gain. Macdearmid and Preston (1969) reported the results of two series of trials carried out in commercial barley beef units in the North of Scotland. Using 312 animals at 17 sites, implantation with 60 mg hexoestrol increased daily gain by 0.28 kg. In the second series, 60 mg increased gains by 0.25 kg per day; feed intake was increased but not proportionately so and feed conversion efficiency was increased from 7.05 to 6.25. Killing out percentages were not affected, and carcasses from the treated animals were less fat. Kilkenny and Sutherland (1970) reported the results from Meat and Livestock Commission recorded barley beef units in 1968 and 1969 where hexoestrol had been implanted or included in the feed. Treated cattle gained 9-12 per cent (0.10 kg per day) faster than untreated but consumed about 0.23 kg per day more feed so that conversion efficiency was not improved by so much. Successive implants in the same animals gave no better results.

Between 1972 and 1976 a series of 25 trials was carried out by ADAS on Experimental Husbandry Farms and on commercial farms to study the



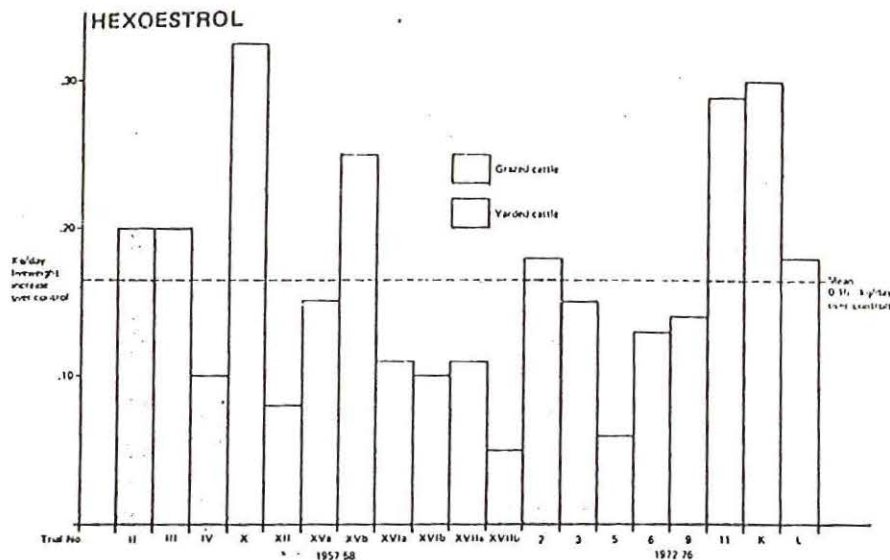


Figure 1

effect of two other growth promoting implants (see below) which became available during that period (Bastiman and Scott, 1977). Hexoestrol was also used in some of the trials, and the results are shown diagrammatically in Figure 1, along with those for the earlier series described above (Jones, 1961). For each experiment (numbered II to XVII b. for the first series and 2 to L for the second) the extra liveweight gain in kg per day following implantation with 45 or 60 mg hexoestrol is shown as an increase over the untreated controls. Experience has shown that it can be misleading to express results as per cent increases over control because these are much influenced by the absolute level of control performance. The results are being reported in detail elsewhere. There was variation in the size of the response, which overall averaged 0.16 kg a day but in only two out of 19 experiments was it less than half this figure. The experiments with yarded as compared with grazed cattle are marked by shading; there is no apparent difference in the size of the response between the two sets of conditions.

The Meat and Livestock Commission carried out a series of trials on 13 commercial farms in the winter of 1975/6. There were in all 17 lots of steers (totalling 1557) roughly equal numbers being 18-month-old Friesian type or suckled calves (MLC, 1976). Implantation of 60 mg hexoestrol increased liveweight gain in 16 of the 17 groups, the average increase being 0.20 kg per day over the controls. In a further series of trials (MLC, 1978) involving 1348 steers at grass on 15 farms the average increase due to implantation of 60 mg hexoestrol was somewhat less, 0.16 kg per day.

The North of Scotland College of Agriculture (1975/76) carried out two trials with crossbred steers on silage plus barley diets. The implantation of 45 mg hexoestrol increased daily gain by 18 and 38 per cent respectively. Galbraith and Watson (1978) have reported a trial with individually fed

In een overzicht over exogene anabolica vermeldt Ross (1981) slechts dat er zeer weinig toxicologische gegevens over hexoestrol bestaan; dienestrol wordt in het geheel niet genoemd.

#### ANALYSE

Door Bergner-Lang (1981) werden de volgende gehalten gevonden in praktijkmonsters.

Kalfsnieren uit Nederland 32 monsters geanalyseerd

1x 0,5 µg/kg dienestrol aangetoond.

Kalfsvlees uit Nederland 12 monsters geanalyseerd

1x 0,42 µg/kg dienestrol aangetoond.

Kalsvlees bevattende gerechten.

In geen van de 16 monsters kon dienestrol worden aangetoond.

Verder werd in een aantal van deze monsters DES, ethynylestradiol, oestron, oestradiol, oestriol, testosteron, androsteron, androstendion en/of progesteron aangetroffen. In geen enkel monster kon Hydroxyprogesteron worden aangetoond.

Deze analyses werden uitgevoerd met een zeer gevoelige GC/MS methode na extractie volgens Verbeke (1979) en Silyleren.

Hydrolyse met Helix Pomatia

Extraktie met methanol

Ontvetten met hexaan

Extraheren met dichloormethaan

Drogen

Opnemen in water

Over XAD-2 kolom elueren met methanol.

Verder Extrelut kolom en Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kolom voor scheiding oestrogenen van androgenen en gestagenen.

Silyleren.

Scheiding op kapillaire kolom en detectie met MS.

Detectiegrenzen

Oestrogenen 0.02 µg/kg

Androgenen, gestagenen tussen 0.02 en 0.05 µg/kg in kindervoeding, bereide maaltijden, vlees en organen.

Een op massaspectrometrie gebaseerde bevestigingsmethode van diethylstilbestrol, hexestrol en dienestrol in runderurine op het µg/l niveau is gerapporteerd door Tuinstra (1982, 1983).

Door Waldschmidt (1972) wordt een methode beschreven voor het aantonen van DES, DE, HEX  $17\alpha$  E<sub>2</sub>,  $17\beta$  E<sub>2</sub>, estron en zeranol in extract en van urine, veevoeders, implantaten, vlees en feces.

De detectiegrenzen zijn voor Hex 0.5 µg. Overige oestrogenen 0.2 µg onder voorwaarde van voldoende gezuiverde extracten.

De detectie berust op tweedimensionale dunnelaagchromatografie, waarbij gesproeid wordt met vanilline in 50% o-fosforzuur (Ferrando, 1968).

Cooper beschrijft een GC methode voor de bepaling van hexestrol op een niveau van  $0.4 \times 10^{-9}$  g. Andere oestrogenen kunnen op analoge wijze bepaald worden. Met de hierop gebaseerde methode kan hexestrol in vlees tot gehalten > 100 ppb worden aangetoond.

Recovery uit 50 g vlees.

Toegevoegd (µg)	Teruggevonden µg
100	54 - 58
10	5,5 - 8
8.7	5.3.

Laitem (1978) beschrijft een gaschromatografische methode voor het aantonen van DES en de verwante verbindingen DE en HEX residuen in vlees en organen van behandeld vee. Er wordt niet gesproken over de manier waarop het vee behandeld is.

De analysemethode is getoetst aan de hand van standaardadditie van DES, HEX en DE aan vlees op resp. 0,5, 0,1 ppb niveau.

Verder wordt er wel gesproken over vlees-monsters, maar het is niet duidelijk of dit praktijkmonsters zijn of monsters die alleen maar zijn opgewerkt voor de recovery van standaardadditieproeven.

Oehrle (1976) kon met dunnelaagchromatografie m.b.v. dansylering DES, DE en HEX gescheiden bepalen, semikwantitatief tot 2-5 ng, kwantitatief tot 10 ng.

Valette (1973) beschrijft een "gevoelige" dunnelaagmethode voor het aantonen van DES, Dienestrol en Hexestrol met behulp van bestraling met UV 254 nm (voor DES en DE) en besproeien met ZnCl<sub>2</sub> en verwarmen (Schuller, 1967). De detectiegrens is voor Hex 400 ng, DE 25-50 ng, DES 50 ng.

De Ruig e.a. (1982) (1983) beschrijven een dunnelaagmethode voor het aantonen van Hex, DES en DE in urine op mg/kg niveau.

Dunnelaag wordt toegepast na voorzuivering met een basische celitekolom. Scheiding van HEX, DES en DE vindt plaats met behulp van deze basische celitekolom, waarbij frakties worden uitgevangen.



## LITERATUUR

F.E. Alder, J.C. Tayler, J.E. Rudman (1964)

Hexestrol implantation of steers fattened at pasture

Anim. Prod. 6 (1964) 47.

E. Allen, E.A. Doisy (1923)

J. Am. Med. Assoc. 81 (1923) 819.

B. Bastiman, B.M. Scott (1977)

Growth promoting implants for beef cattle

Anim. Prod. 24 (1977) 131 (Abstr.).

B. Bergner-Lang, M. Kächele (1981)

Anabolica in Kalbfleisch

Nachweis und Bestimmung, Befunde und Beobachtungen

Deutsche Lebensmittel-Rundschau 77 (1981) 305-313.

T.D. Burgess, G.E. Lamming (1960)

The effect of diethylstilboestrol, hexoestrol and testosterone on the growth rate and carcass quality of fattening beef steers

Anim. Prod. 2 (1960) 93.

E.H. Callow, D.J. Finney (1959)

Some effects of implanting hexoestrol on the growth of steers

J. Agric. Sci. Camb., 53 (1959) 404.

P.J. Cooper, M.J. de Faubert Maunder and G.J. McCutcheon (1977)

Detection and determination of hexoestrol in meat

Analyst 92 (1967) 382-386.

R.M. Crabtree (1978)

Personal communication.

S.N. Dixon, R.J. Heitzman (1981)

Residues of exogenous anabolic agents in beef cattle and sheep

Proceedings EEC Workshop, March 5th and 6th, 1981, 58-69.

S.N. Dixon, R.J. Heitzman (1983)

Measurement of the synthetic anabolic agents in the tissues of farm animals

Anabolics in animal production, O.I.E. Symposium Parijs, 15-17 feb. 1983.

D.Exley, A. Dutton (1969)

Steroids 14 (1969) 575-590.

G.C. Everitt (1962)

Implantation of oestrogenic hormones in beef cattle. Effects of winter nutritional depression following autumn implantation of hexoestrol and of re-implanting in spring

New Zealand J. Agric. Research 5 (1962) 62.

R. Ferrando, A. Bernard (1968)

Essai de séparation de l'hexoestrol, du dienoestrol et du diethylstilbestrol Bull. Soc. Chim. Biol. 50 (1968) 1855.

J.T. Forbes, A.M. Raven, K.L. Robinson (1964)

Some effects hexoestrol and level of dietary protein on performance of intensively fed cattle

Rec. Agric. Res. Min. Agric. Northern Ireland 13 (1964) 91.

H. Galbraith, T.B. Miller (1977)

Effect of trienbolone acetate on the performance, blood metabolites and hormones and nitrogen metabolism of beef heifers

Anim. Prod. 24 (1977) 133 (Abstr.).

D.J. Harwood, R.J. Heitzman, A. Jongney (1980)

A radioimmunoassay method for the measurement of residues of the anabolic agent, hexoestrol, in tissues of cattle and sheep

J. Vet. Pharmacol. Therap. 3 (1980) 245-254.

R.J. Heitzman, S.N. Dixon, D.J. Harwood (1981)

The measurement of residues of anabolic agents in tissues of farm animals and meat

Papers 76th Meeting of the British Society of Animal Production, Animal Production 32 (1981) 359-360.

R.J. Heitzman, D.J. Harwood (1983)

Radioimmunoassay of hexoestrol residues in faeces, tissues and body fluids of bulls and steers

Veterinary Record 112 (1983) 120-123.

B. Hoffmann (1981)

Aspects on metabolism, residue formation and toxicology of growth promoters

Archiv. f. Lebensm.hg. 32 (1981) 65.

B. Hoffmann, H. Karg (1976)

Metabolic fate of anabolic agents in treated animals and residue levels in their meat in environmental quality and safety

F. Coulston, F. Corte. Eds Suppl. vol. 5. Anabolic agents in animal production (1976). Georg Thieme Verlag, Stuttgart Germany p. 181-191.

B. Hoffmann, W. Laschütza (1980)

Entwicklung eines Radioimmunotests zur Bestimmung von Diäthylstilbestrol in Blutplasma und essbaren Geweben vom Rind.

Arch. f. Lebensmittelhyg. 31 (1980) 105.

B. Hoffmann, G. Oettel (1976)

Radioimmunoassay for free and conjugated trienbolone and for trienboloneacetate in bovine tissue and plasma samples

Steroids 27 (1976) 509.

L.G. Huis in 't Veld et al. (1966<sup>1</sup>)

Urinary excretion of stilbene derivatives in cattle after intramuscular injection of Desexine.

Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 14 (1966).

L.G. Huis in 't Veld et al. (1966<sup>2</sup>)

Het onderzoek van kalverurine op stoffen met oestrogene werking en op stilbeenderivaten

Meded. Volksgezondh. 12 (1966) 284-291.

L.G. Huis in 't Veld, E.B. Jonkman-Van den Broek, W.G. de Groot  
(1969<sup>1</sup>)

The concentration of oestrogenic substances in musculature and organs  
of calves following injection of diethylstilbestrol and hexoestrol  
The Netherlands Journal of Veterinary Science 2 (1969) 85-90.

L.G. Huis in 't Veld, E.B. Jonkman-van den Broek, W.C. de Groot, H.C.  
Carnel-Krüsel (1969<sup>2</sup>)

The concentration of substances with oestrogenic activity in the  
musculature of the injection site and in urine of calves given  
diethylstilbestrol and hexoestrol  
Neth. Journ. of Vet. Science 2 (1969) 171-178.

L.G. Huis in 't Veld, E.B. Jonkman-van den Broek, W.C. de Groot, H.C.  
Krüsel (1969<sup>3</sup>)

Het gehalte aan stoffen met oestrogene werking in de musculatuur van  
de injectieplaats en in de urine van kalveren voor toediening van  
diethylstilboestrol en hexestrol  
Tijdschrift voor Diergeneeskunde 94 (1969) 169-178.

T. Imori, S. Nakama (1967)  
Japanese J. Anim. Repro 13 (1967) 26-34.

P.J. Jones (1961)  
Implantation of cattle for beef with hexoestrol  
Experimental Husbandry no. 6 (1961) 62.

R.M. Kay, C.B. Mallinson, W. Little (1977)  
Growth rate, feed conversion ratio and age at puberty of dairy heifers  
implanted with anabolic steroids  
Anim. Prod. 24 (1977) 133 (Abstr.).

J.B. Kilkenney, J.E. Sutherland (1970)  
Use of hormone administration in commercial beef production in the  
U.K.  
The Veterinary Record 87 (1970) (24), 734.



- R. Kroes, E.J. Ruitenbergh, H. Berkvens (1970)  
Histological changes in the genital tract of the female calf after  
administration of DES and HEX  
Zbl. Vet. Med. 17 (1970) 440-452.
- R. Kroes, E.J. Ruitenbergh, H. Berkvens (1971)  
Onderzoek naar de veranderingen van het geslachtsapparaat van het kalf  
na toediening van DES en HEX  
T. Diergeneesk. 96 (1971) 375-383.
- L. Laitern, P. Gaspar, I. Bello (1978)  
Stable derivatives for the gaschromatographic determination of synthetic anabolic stilbene residues (diethylstilbestrol, dienestrol and hexestrol) in meat and organs of treated cattle at the sub-parts per billion ( $10^9$ ) level  
Journal of chromatography 156 (1978) 267.
- G.E. Lamming (1958)  
Recent developments in the use of growth stimulants in farm animals  
J. Royal Agric. Society of England 119 (1958) 41.
- A. MacDearmid, T.R. Preston (1969)  
A note on the implantation of intensively-fed beef cattle with hexoestrol  
Anim. Prod. 11 (1969) 419.
- K. Oehrle (1976)  
Determination of estrogenic steroids and stilbenes in the urine of calves by fluorimetric measurement of dansylated derivatives  
Acta Endocrinol. 82 supp. 202 (1976) 61-63.
- H. Ono, K. Nakama, K. Tohyama, T. Imamicki (1977)  
Residual presence of hexestrol dicaprylate at the site of injection into pectoral muscle in broilers  
Bull Nippon Veterinary and Zootechnical College 28 (1979) 36-43.



R.H. Roberson, V. Trujillo (1975)

The effect of methionine, thiouracil, dienestrol diacetate and thyroprotein at the development and prevention of fatty liver in pullets

Poultry Science 54 (1975) 715-721.

D.B. Ross (1981)

Toxicology of endogenous anabolic agents

Proceedings EEC Workshop, March 5th and 6th, 1981, 139-150.

J.J. Ryan (1976)

Chromatographic analysis of hormone residues in food

Journal of chromatography 127 (1976) 53.

W.G. de Ruig, J.M. Weseman, G.M. Binnendijk (1982)

Het aantonen van diethylstilbestrol, dienestrol en hexestrol in urine  
RIKILT rapport 82.39 (1982).

W.G. de Ruig, J.M. Weseman, G.M. Binnendijk (1983)

Het aantonen van diethylstilbestrol, dienestrol en hexestrol in urine  
met behulp van dunnelaagchromatografie  
RIKILT rapport 83.16 (1983).

P.L. Schuller (1967)

The detection of diethylstilbestrol (DES) in urine by thin layer chromatography

J. of Chromatography 31 (1967) 237-240.

A.M. Scott (1978)

The use of growth promoting implants in beef production  
ADAS Quart. Rev. 31 (1978) 185.

J.I. Smith, P.C. Williams (1948)

Biochem. J. 42 (1948) 253-257.

R.E. Stuckey, J. Allen, L. Brealey, J.A. Potter, W.J. Sheppard (1963)

Analyst (London) 88 (1963) 925.

H. Tobiooka et al. (1979)

Gaschromatographic determination of hormonal residues in tissues of steers and sheep injected with hexestrol diacaprylate

FSTA 11 (1979) 198-199.

G. Tiecco (1961)

Vet. Ital. 12 (1961) 447.

H. Tobiooka, R. Kawashima (1978)

Modified method for electron capture GC determination of hexestrol residues in bovine tissues

J. AOAC 61 (1978) 1054-1057.

L.G.M.Th. Tuinstra, W.A. Traag, H.J. Keukens (1982)

Overzicht stand van zaken m.b.t. het ontwikkelen van analysemethoden voor het bepalen van enkele hormonen m.b.v. GC-MS

RIKILT-rapport 82.80 (1982).

L.G.M.Th. Tuinstra, W.A. Traag, H.J. Keukens (1983)

Een op massaspectrometrie gebaseerde bevestigingsmethode van diethylstilbestrol, hexestrol en dienestrol in runderurine op het µg/l niveau

RIKILT-rapport 83.47, 1e versie, bestemd voor EVATH (1983).

J.P. Valette, R. Ferrando (1973)

Test d'identification par chromatographie en couche mince des oestrogenes dans les extraits de viandes et d'implants d'organes d'animaux

Ann. Fals. Exp. Chim. 1973, 210.

R. Verbeke (1979)

Method of analysis for detecting anabolic substances in tissue of slaughter animals (1979)

Doc.no. 2582/VI/79 EEG.

K. Vogt, K.L. Oehrle (1970)

Dünnschicht chromatographische Identifizierung und Bestimmung von Steroidostrogenen und Stilbenderivaten in Kälberurin als Dansylester

Arch. f. Lebensmittelhyg. 28 (1970) 44.

K. Vogt, M. Waldschmidt, H. Karg (1970)

Bestimmung von Ausscheidungsverlauf und Rückständen von Diäthylstilbestrol nach intramuskulärer Verabreichung beim Kalb mit Hilfe biologischer und chemischer Nachweisverfahren

Berl. Munch. Tierarztl. Wsch. 83 (1970) 457.

H. Waes (1970)

Rev. Agri (Brussels) 23 (1970) 1135.

M. Waldschmidt (1972)

Einfacher, dünnschichtchromatographischer Screening-Test zur Differenzierung von Östrogenen in Extrakten

Archiv. für Lebensmittelhygiene (1972) 76-77.